

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861759

研究課題名(和文)甘味受容体機能の解明

研究課題名(英文)Analysis for the function of sweet receptor

研究代表者

實松 敬介 (SANEMATSU, Keisuke)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70567502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：甘味受容体T1R2/T1R3と甘味抑制物質ギムネマ酸の相互作用を甘味受容体再構築系を用いて解明することを目指した。分子モデリングによりヒト T1R3 の膜貫通ドメインにギムネマ酸が結合することが推定された。さらにアミノ酸残基の点変異の解析により、第3、第5、第6、第7ヘリックスで囲まれたドメインにギムネマ酸が結合している可能性が強く示唆された。また、ギムネマ酸のグルクロノシル基が甘味抑制に重要な役割を担っていることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Gymnemic acids (GAs) are triterpene glycosides that selectively suppress taste responses to various sweet substances without affecting salty, sour, and bitter compounds. To elucidate interaction between sweet receptor and GAs, we used the sweet receptor T1R2 + T1R3 assay in transiently transfected HEK293 cells. We found that interaction site for GAs was the transmembrane domain of hT1R3. Glucuronic acid, the common structure of gymnemic acids, also reduced sensitivity to sweet compounds, suggesting that the glucuronosyl group of GAs is required for sweet-suppressing effect.

研究分野：医歯薬学

キーワード：味覚 甘味受容体 甘味抑制物質 ギムネマ酸

1. 研究開始当初の背景

甘味受容体 T1R2/T1R3 は、G タンパク質共役型受容体(GPCR)であり、その構造的特徴はサブファミリー分子である mGluR1 の X 線結晶構造解析により明らかにされている。主に下流の G タンパク質を活性化させる 7 回膜貫通ドメイン、それに続くシステインを多く含む C リッチドメイン、さらに大きな細胞外ドメインを含む N 末端ドメインにより構成される。特徴としてヘテロマーを形成することで甘味受容体として機能し、複数の結合ドメインを有することが知られている。例えば、人工甘味料アスパルテームは、ヒト T1R2 の N 末端ドメイン、人工甘味料シクラメートはヒト T1R3 の膜貫通ドメインに作用する。しかしながら糖類、人工甘味料、甘味アミノ酸、甘味タンパク質等、様々な異なる立体構造を呈する甘味物質に対し、甘味受容を担う T1R2/T1R3 の機能の多くは不明である。甘味感受性には種差があり、植物のギムネマシルベスタに含まれるトリテルペン配糖体・ギムネマ酸はヒトの甘味を抑制するが、マウスには無効である。これらの異なる感受性は、系統発生や進化の過程において、食環境に適応した種特異的な甘味受容体のアミノ酸変異に基づくものと推定される。これまで我々は、甘味受容体 T1R2/T1R3 再構築系を用いて、ギムネマ酸はヒト T1R2/T1R3 の甘味応答を抑制するが、マウス型には効かないことを確認していた。また、ギムネマ酸の効果に種差(マウスには無効)があることを利用し、ヒト・マウス・キメラ体のギムネマ酸の効果を検索したところ、ギムネマ酸感受性にはヒト T1R3 の膜貫通ドメインが不可欠であることが示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、甘味受容体 T1R2/T1R3 のヒト型、マウス型およびそのキメラを HEK293 細胞に強制発現させた甘味受容体再構築系を用い、甘味受容体と味覚修飾物質であるギムネマ酸との相互作用を調べた。さらに分子モデリングを用いることで、ギムネマ酸がどのように甘味受容体に結合し甘味抑制を示すのか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

甘味受容体 T1R2、T1R3 および Ga16-gust44 を HEK293 細胞にリポフェクション法により強制発現させた。甘味応答は、カルシウムイメージング法により測定を行い、環流下に甘味溶液、味覚修飾物質を流し、細胞内カルシウム濃度を測定、味覚修飾効果を評価した。導入遺伝子は、マウス、ヒト T1R2/T1R3、マウス、ヒト異種間のキメラ体、および点変異を導入した T1R2/T1R3 を用い、ギムネマ酸および構造活性相関によって得られた甘味抑制物質候補に対する感受性の評価を行った。結合に参与するアミノ酸残基あるいは感受

性に種差を与える可能性のあるアミノ酸残基に対し点変異の導入を行った。得られたデータを基にドッキングシミュレーション解析を行い、詳細な結合モデルを作成し、味覚修飾物質が甘味受容体にどのように結合、修飾するかを検討を行った。

4. 研究成果

ギムネマ酸は、複数の類似構造を有する化合物の総称であり、甘味を抑制するのはギムネマ酸 I から IV であることが知られている。今回 X 線構造解析により新たに解かれた甘味受容体と同じクラス C に属する mGluR1 の膜貫通ドメインの構造を基に、ホモロジーモデリングによりヒト T1R3 の膜貫通ドメインを予測した。さらにドッキングシミュレーションにより各ギムネマ酸とヒト T1R3 の膜貫通ドメインとの結合モデルを作成した。その結果、いずれのギムネマ酸も類似した結合の特徴を示した(図 1, 2)。

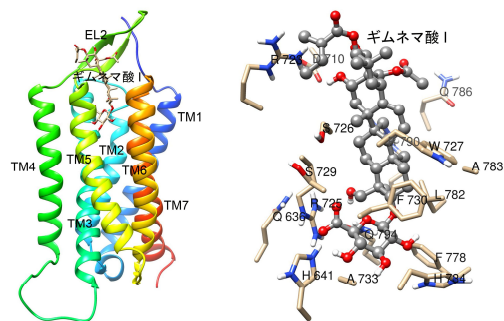


図 1 ヒト T1R3 膜貫通ドメインに結合するギムネマ酸の分子モデル 左：全体像、右：結合ポケットの詳細

以前報告された甘味抑制物質ラクチゾールは、ヒト T1R3 の膜貫通ドメインに結合することが予測され、同部位において変異を与えるとラクチゾールの感受性がおちるアミノ酸残基が明らかにされている。ギムネマ酸は、ヒト T1R3 の膜貫通ドメインにおいてラクチゾールの感受性に重要なアミノ酸残基(TM3: His-641^{3,33}, TM5: Ala-733^{5,46}, TM6: Phe-778^{6,51}, TM7: Leu-798^{7,36})を含む第 3、第 5、第 6、第 7 ヘルックスで囲まれたポケットに結合することが予測された。ギムネマ酸のカルボキシル基が細胞膜側に向き第 3 ヘルックスの His-641^{3,33} と近接し、トリテルペン骨格が細胞外に向いた状態で第 6 ヘルックスの Phe-778^{6,51} と近接していた。ギムネマ酸周囲のアミノ酸残基に変異を加えた再構築系でギムネマ酸の効果調べると、甘味抑制効果が減少し、ギムネマ酸が同部位に結合している可能性が強く示唆された(図 3)。また今回新たに細胞外ループの Arg-725 がギムネマ酸特異的な結合に参与していることを明らかにした(図 1 - 3)。

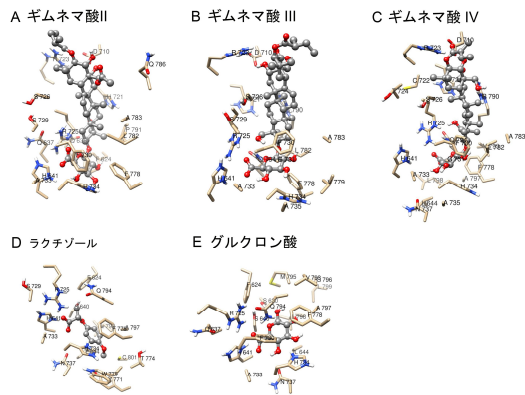


図2 各ギムネマ酸(A:ギムネマ酸 I, B: ギムネマ酸 II, C: ギムネマ酸 III, D: ギムネマ酸 IV)、ラクチゾール(D)およびグルクロン酸(E)のヒト T1R3 膜貫通ドメインにおける結合モデル

さらにラクチゾールとヒト T1R3 の膜貫通ドメインの結合モデルとの比較から、ギムネマ酸による甘味抑制には、ギムネマ酸のグルクロナシル基が深く関与している可能性が推定された。甘味受容体再構築系によりグルクロン酸と甘味受容体との相互作用を調べた結果、グルクロン酸が甘味物質サッカリンに対する応答を抑制することが明らかになった。また変異体解析では、A733^{5.46}V、H641^{3.33}A、および F778^{6.51}A においてグルクロン酸の感受性が減少しており、グルクロン酸もヒト T1R3 の膜貫通ドメインに作用することが推定された。このことから、ギムネマ酸のグルクロナシル基が甘味抑制に深く関与している可能性が示唆された(図 3)。

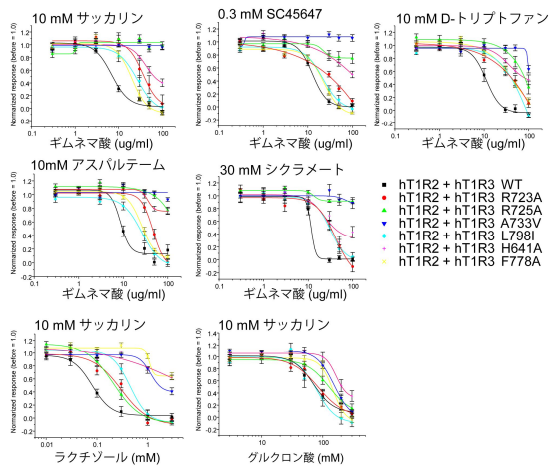


図3 ヒト T1R3 各変異体におけるギムネマ酸処理後の各甘味応答の変化とラクチゾールおよびグルクロン酸の甘味抑制効果

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Sanematsu K, Yoshida R, Shigemura N, Ninomiya Y.

Structure, Function, and Signaling of Taste G-Protein Coupled Receptors. *Curr Pharm Biotechnol.*, 査読あり 15(10):951-96, 2014

Sanematsu K, Kusakabe Y, Shigemura N, Hirokawa T, Nakamura S, Imoto T, Ninomiya Y.

Molecular Mechanisms for Sweet-suppressing Effect of Gymnemic Acids. *J Biol Chem.*, 査読あり 12;289(37):25711-20, 2014

DOI: 10.1074/jbc.M114.560409.

〔学会発表〕(計 6 件)

實松 敬介, 日下部裕子, 重村 憲徳, 広川 貴次, 中村 誠司, 井元 敏明, 二ノ宮裕三, Glucuronosyl group of gymnemic acids mainly interacts with the transmembrane domain of human T1R3 in sweet-suppressing effect., 第 120 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 第 92 回 日本生理学会大会 合同大会, 2015.03. 21-23 神戸

實松 敬介, 中野 (安松) 啓子, 重村 憲徳, 二ノ宮 裕三, The molecular mechanisms involved in taste modifying effect of gymnemic acids examined by sweet-sensor, 第 48 回知覚コロキウム 国際五感シンポジウム, 2015.03. 6-8 日田

中野 (安松) 啓子, 實松 敬介, 二ノ宮裕三, The effect of gymnemic acids on taste and the recovery by r-cyclodextrin, 第 48 回知覚コロキウム 国際五感シンポジウム, 2015.03. 6-8 日田

實松 敬介, 甘味受容体 T1R2/T1R3 の分子メカニズム, 細胞センサーの分子機構・相互関連・ネットワーク研究会, 2014.12.4-5 岡崎

上瀧 将史, 實松 敬介, 重村 憲徳, 二ノ宮 裕三, 腸管内分泌細胞の味覚感受性に対するレプチンの効果, 第 64 回西日本生理学会, 2013.10.18. 北九州

實松 敬介, 日下部裕子, 重村 憲徳, 広川 貴次, 井元 敏明, 二ノ宮 裕三, 甘味受容体機能の解析, 味と匂学会第 47 回大会, 2013.09. 5-7 仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/sosiki/a06/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

實松 敬介 (SANEMATSU, Keisuke)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：70567502

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

無し ()

研究者番号：